

Title	分裂酵母核膜タンパク質によるゲノム安定維持の分子機構の研究
Author(s)	衣笠, 泰葉
Citation	大阪大学, 2019, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/72613
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論文内容の要旨

氏 名 (衣 笠 泰 葉)

論文題名

分裂酵母核膜タンパク質によるゲノム安定維持の分子機構の研究
(Molecular mechanisms for genome stability maintenance by nuclear membrane proteins in fission yeast)

論文内容の要旨

真核細胞のゲノムは核膜によって囲まれ、細胞質とは隔離されている。核膜には、複雑な遺伝子発現制御を行うための足場としての役割があり、このような核膜の役割は、ゲノムを安定に維持する機構として必要不可欠である。核膜内膜タンパク質は、クロマチンを核膜に結合させることで遺伝子発現制御を行っていることで知られているが、まだその機能の全容は明らかとなっていない。Lem2は、多くの生物で保存されている核膜内膜タンパク質であり、ヘテロクロマチンの制御を行い、さらに染色体の安定性にも寄与していることが分裂酵母の系にて報告されている。また、分裂酵母Lem2は、同じく核膜内膜であるBqt4と二重欠損させることで細胞が致死となることが分かっている。これらはどちらもクロマチンの核膜結合に寄与しており、ゲノムの安定的な維持に重要であると考えられることから、これらLem2とBqt4の関与する機構について調べた。

本研究では、まず、Lem2にBqt4が結合し、Lem2の細胞内局在を制御していることが明らかにした。Lem2は通常核膜全体に局在しているが、Bqt4を欠損すると分裂酵母における中心体であるSpindle pole body (SPB) に強く集積することが分かった。そして、Lem2のBqt4結合ドメインを調べるとBqt4はLem2のN末端領域に結合していたことから、この領域を欠損させたLem2断片の局在を調べると、Bqt4欠損時同様にSPBへの集積が起こった。このことは、Lem2にBqt4が結合することで、Lem2を核膜全体へと留めていると考えられる。一方、Lem2とBqt4の二重欠損が致死となることを用いて、Lem2の機能ドメインを調べた。すると、Bqt4結合ドメインのあるN末端領域を欠損した断片でもLem2の機能を相補したため、Lem2-Bqt4の結合はLem2の機能には必要なく、独立な機能であることが明らかとなった。また、同様の実験により、残りの核膜内腔領域、C末端領域はどちらも機能に必須であることが分かった。核膜内腔領域はSPBへ弱く集積することから、Lem2の核膜内腔領域が核膜内腔中で核膜外膜タンパク質やERタンパク質と相互作用していることが考えられる。一方、Lem2C末端領域は局在に全く影響していなかったことから、Lem2C末端の機能は局在とは独立していると考えられる。そして、Error-prone PCR法によりLem2の温度感受性変異体をスクリーニングすると、Lem2C末端領域に変異が集中していた。このC末端領域は高次構造を形成することが予測されており、その構造が種間で保存されていることから、Lem2末端の高次構造がLem2の機能として重要であることが示唆された。

また、本研究では、Lem2・Bqt4の二重欠損によって核膜構造に異常が生じて致死となること、さらに極長鎖脂肪酸生産量の増加により致死性が相補されることを明らかにした。分裂酵母ゲノムDNA断片を持つ多コピープラスミドによるスクリーニングを行ったところ、*eIol2*遺伝子の過剰発現がLem2とBqt4の二重欠損の致死性を相補した。*eIol2*遺伝子がコードするElo2はヒトなどの脂肪酸伸長酵素のホモログである。ヒトと出芽酵母の脂肪酸伸長酵素を用いた相補実験、及び液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析法により、Elo2は極長鎖脂肪酸合成に寄与していることが示された。よって、Elo2の過剰発現により極長鎖脂肪酸、及びその代謝物であるセラミドの量の増加がすることが、Lem2・Bqt4二重欠損の致死性を相補したと考えられる。さらに、Lem2とBqt4を欠損すると、核内に留められている各タンパク質が核外へと一過的に漏出する現象が見られた。そして、Lem2・Bqt4二重欠損では高頻度に漏出し、その漏出度合いが高いほど、細胞の増殖が阻害されていることが分かった。こうした細胞を電子-光相関顕微鏡法 (CLEM法) を用いて観察すると、核タンパク質が漏出している細胞では高頻度に核膜構造の異常が見られた。このことから、Lem2・Bqt4二重欠損では核膜が破損し、核質が流出してしまうことによって致死となっていると考えられる。このことはつまり、Lem2とBqt4は核膜構造の維持に寄与していることを示している。これらの結果から、核膜内膜タンパク質、及び脂質合成が協調して核膜の維持を行っているという新たな知見が得られた。すなわち、核膜タンパク質と脂質のバランスが核膜構造の維持、ひいては真核生物におけるゲノムの安定的な維持機構としても重要であると考えられる。

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (衣笠 泰葉)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	平岡 泰
	副 査	教授	深川 竜郎
	副 査	教授	甲斐 歳恵
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>衣笠泰葉は、分裂酵母の核内膜タンパク質がクロマチン機能に与える影響の研究を行うなかで、核内膜タンパク質Lem2とBqt4の相互作用が細胞増殖に重要な働きをすることに気づいた。Lem2とBqt4はそれぞれ単独で欠損しても細胞は生育できるが、両方を欠損すると生育できなくなる。この現象の背後にある分子レベルの仕組みを理解するために、多くの遺伝的改変を重ねて解析を行い、Bqt4との相互作用がLem2の細胞内局在を制御し、細胞の生存に影響することを明らかにした。さらに、Lem2・Bqt4二重欠損を相補する遺伝子として、超長鎖脂肪酸伸長酵素の遺伝子 <i>elo2</i> を見いだした。超長鎖脂肪酸は細胞外から取り込むことができず、細胞内での合成が必須である。分裂酵母はElo2を欠損すると成育できないが、ヒト超長鎖脂肪酸伸長酵素を発現することによって成育を回復することを明らかにした。このことから、核膜機能の維持に脂肪酸代謝が重要な役割を果たし、その機能は酵母からヒトまで保存されていると結論された。これは、超長鎖脂肪酸が核膜機能に必須であることを示した初めての報告であり、当該分野に独自の貢献を為した。</p> <p>よって、博士の学位を授与するに値すると認める。</p>			